



FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE
MEDICALE

REFERENCE : SH FORM 44

INDICE DE REVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE : ISOLEMENT ET ENSEMENCEMENT DE CHAMPIGNONS

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande :	Echantillons biologiques de patients ou systèmes utilisés pour la conservation et /ou le transport de souches
Principe de la Mesure :	Ensemencement de divers prélèvements en vue d'isolement de levures ou champignons filamenteux et Identification mycologique
Méthode de mesure :	Méthodes manuelles
Marquage CE (Oui/Non)	OUI
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	

MISE EN OEUVRE

Opérateurs (Habilitation) :	Technicien(ne)s Secteur Mycologie
Procédure de validation :	LABO/GEN/GU/001
Procédure de gestion de la portée flexible :	LABO/GEN/PR/006
Période d'évaluation :	2007 → 2014
Date de mise en service :	01/10/2014
Autorisation par :	M GARI-TOUSSAINT

MAITRISE DES RISQUES

analyse des risques en mycologie LABO- PAR-FI-067



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urines, selle, LBA....) Type de récipient (crachette, écouvillon, ...)	Echantillons multiples (urines, échantillons pulmonaires...)	Manuel de prélèvement du Pôle de Biologie du CHU de NICE (gestion documentaire intranet/extranet)
Prétraitement de l'échantillon	Traitement différent en fonction de l'échantillon	Mode opératoire ensemencement en mycologie LABO-PAR-MO-001
Main d'œuvre (habilitation du personnel)	Habilitation du personnel	Fiche d'habilitation mycologie dermatophytes, environnement LABO/PAR/FH/001 Fiche d'habilitation mycologie routine LABO/PAR/FH/002 Fiche de tutorat LABO-PAR-FI-059
Conditions ambiantes requises	Température ambiante	Relevé des températures ambiantes
Références des réactifs	- Tubes Sabouraud chlomphenicol Ref : 221825 Becton Dickinson - Tubes Sabouraud chloramphenicol +actidione Ref : 297649 Becton Dickinson - milieu Pagano fabrication interne * Ref gélose Saboubouraud gentamicine clhoramphénicol 42056 Biomérieux * Réf Tetrazolium VWR 721L49398 - NaCl 0.085%: ref selon marché - Digester : réf DDODIG00 Eurobio	Respect des conditions de conservation Vérification des dates de péremption et lots pour les réactifs achetés → gestion des stocks (gesStock) LABO/PAR/PR/010 → test acceptation des lots : tests et contrôle qualité en mycologie LABO/PAR/FI/023
	CQi :	test acceptation des lots : tests et



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

MAITRISE DES RISQUES		
analyse des risques en mycologie LABO- PAR-FI-067		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
	<ul style="list-style-type: none"> - ATCC Ckru 6258 - ATCC Calb 90028 - Souches identifiées au laboratoire 	contrôle qualité en mycologie LABO/PAR/FI/023
Equipements	Etuves	Fiche de vie matériel LABO/GEN/DS/016 Relevé journalier des températures + Cartographie tous les 5ans Nettoyage et désinfection des surfaces+ Contrôles de l'air mensuel (Hygiène et Bionettoyage LABO-PAR-FI-035)
	PSM	Fiche d'utilisation LABO-PAR-FI-042 et fiche de vie du matériel LABO-GEN-DS-016 Contrôle tous les 6 mois du flux Nettoyage et désinfection des surfaces+Contrôles de l'air mensuel (Hygiène et Bionettoyage LABO-PAR-FI-035)
	Réfrigérateurs et congélateurs	Fiche de vie matériel



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

MAITRISE DES RISQUES		
analyse des risques en mycologie LABO- PAR-FI-067		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
		LABO/GEN/DS/016 Cartographie tous les 5ans Relevé journalier des températures/ sondes sirius
	Chambre froide	Fiche de vie matériel LABO/GEN/DS/016 Cartographie tous les 5ans Relevé journalier des températures
	Pipettes	Fiche de vie du matériel LABO- GEN-DS-016 Fiche d'utilisation LABO-PAR-FI- 043 Vérification annuelle
	Cyto centrifugeuse	Fiche de vie matériel LABO/GEN/DS/016 Fiche d'utilisation LABO-PAR-FI- 038 Maintenance annuelle
	Centrifugeuses	Fiche de vie du matériel LABO- GEN-DS-016 fiche d'utilisation Maintenance



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

MAITRISE DES RISQUES

analyse des risques en mycologie LABO- PAR-FI-067

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
		annuelle
Exigences informatiques* spécifiques	Logiciel GLIMS Logiciel GESSTOCK	Système informatique Glms enregistrement de dossiers non-conformes, modification de compte rendu, EEQ, envoi extérieur LABO/PAR/MO/019

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

- CIQ à chaque changement de lot de milieu (confère fiche test et contrôle qualité en mycologie LABO/PAR/FI/023)
- EEQ :
 - o Contrôle UK NEQUAS (tri annuel)
 - o Contrôle **national ANSM** (annuel, 1 échantillon)
 - o Contrôle CTCB (bi annuel)



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES

Inter échantillon pour les paramètres sensibles :	NA
Inter réactif si nécessaire :	NA
Vérification bibliographique :	<p>Milieu PAGANO Performance of selective and differential media in the primary isolation of yeasts from different biological samples. Silva JO1, Franceschini SA, Lavrador MA, Candido RC.</p> <p>Pagano-Levin Candida test medium: evaluation using vaginal samples. Sinski JT, Kelley LM, Reed GL.J Clin Microbiol. 1975 Feb;1(2):206-11. EH.Appl Microbiol. 1966 Jul;14(4):525-8.</p> <p>Modified Pagano Levin medium to isolate Candida species. Stedham MA, Kelley DC, Coles EH. Appl Microbiol. 1966 Jul;14(4):525-8.</p> <p>- Tetrazolium medium as an aid in the routine diagnosis of Candida1. MAIRE J. DENNY AND BETTY M. PARTRIDGE. J. clin. Path. (1968), 21, 383-386</p>
Vérification sur site :	<p>Nous avons ensemencé 2 souches ATCC <i>Candida albicans</i> et <i>Candida Krusei</i> , chacune sur 30 géloses sur une période de 30 jours (même lot de gélose). La pousse a été observé à 48H, suivi d'une identification par TEST LATEX BLCA FUMOUCZE pour <i>Candida albicans</i> et TEST LATEX CKRU pour <i>Candida krusei</i>. Les résultats montrent que la pousse est suffisante pour une bonne identification de 100% pour <i>Candida albicans</i> et de 100% pour <i>Candida krusei</i>. Le test de stérilité (absence de contamination) Ces 2 critères permettent la validation et l'utilisation de ces géloses pour l'ensemencement en</p>



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode
de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

mycologie. (Annexes 1). D'autre part, l'utilisation de ces géloses sur 30 jours permet de définir une date de péremption de 30 jours. (Annexes 4).

COMPARAISON DE METHODES

1. Corrélation entre examen direct et culture mycologique

La corrélation entre les résultats (positif/négatif) de l'examen direct et de la culture a été étudiée sur la période du 01/09/2014 au 30/09/2014 (Annexe 2). Cette étude de corrélation permet d'évaluer les performances de l'isolement en culture (sur géloses et tube cités ci-dessus).

Les résultats sont corrélés dans 83.12% des cas (n=231).

Parmi les cas discordants (n=39) :

- "examen direct négatif, culture positive" n=30

- Dans le cas d'une culture peu abondante, ceci peut s'expliquer par une sensibilité moindre de l'examen direct.

- Dans le cas d'une culture abondante, il peut s'agir d'un échantillon non homogène ce qui est fréquent dans les échantillons de la sphère respiratoire).

- "examen direct positif/culture négative" (n=9) peut s'expliquer par un traitement antifongique en cours chez le patient sous réserve que les conditions d'analyse requises aient été respectées.

2. Comparaison gélose CANDICHROM versus gélose PAGANO

Nous avons comparé nos géloses à partir de milieux PAGANO (méthode de fabrication interne à notre laboratoire), utilisées pour l'isolement des levures et filamenteux à des géloses commercialisées Candichrom II (chez Elitech). Le test a été fait sur 8 échantillons divers provenant de 8 patients différents. Dans 5 cas, nous avons isolé *Candida albicans* avec les 2 techniques. mais 2 cas sur cinq présentaient une contamination bactérienne sur le milieu Candichrom. Dans 1 cas, on retrouve *Geothricum* sur les deux milieux. Dans deux cas, nous avons isolé *Candida albicans* et *Candida glabrata* sur le milieu PAGANO alors qu'on a isolé que *Candida albicans* avec présence de contamination bactérienne sur le milieu Candichrom.

Cette comparaison démontre que la pousse de bactérie sur le milieu Candichrom gêne la lecture, la numération et potentiellement la pousse des levures. Le milieu colore en bleu/vert uniquement *Candida albicans*, les autres levures apparaissant couleur crème, on ne peut pas différencier les autres espèces/genre. (Confère Annexe n°3)

3. **Etude des GELOSE PAGANO** (stérilité et dessèchement) : Nous avonsensemencé 2 souches ATCC *Candida albicans* et *Candida Krusei*, chacune sur 30 géloses sur une période de 30 jours (même lot de gélose). La pousse a été observé à 48H, suivi d'une identification par TEST LATEX BLCA FUMOUE pour *Candida albicans* et TEST LATEX CKRU pour *Candida krusei*. Le résultat montre que la pousse est suffisante pour une bonne identification de 99.66% pour *Candida albicans* et de 100% pour *Candida krusei*. Le test de stérilité (absence de contamination) et de dessèchement est valide à 100%. Ces 3 critères permettent la validation et l'utilisation de ces géloses pour l'ensemencement en mycologie.



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode
de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

(Annexes 3,4). D'autre part, l'utilisation de ces géloses sur 30 jours permet de définir une date de péremption de 30 jours. (Annexes 3,4). Nous avons réalisé un test de dessiccation sur des géloses Pagano sur une période 30 jours qui permet de confirmer que nos géloses peuvent être utilisées jusqu'à 30 jours (annexe 4)

Commentaires

Chaque fois que le contexte le justifie, c'est-à-dire lorsqu'il existe un critère de gravité lié au patient (statut immunologique, état clinique, pathologie sous-jacente) et/ou à la nature du champignon isolé et/ou au site d'isolement du champignon, le résultat est discuté avec le clinicien en charge du patient.

Ceci, soit par communication téléphonique, soit pour certains services au cours de réunions multi-disciplinaires (réunion hématologie/microbiologie, cellule antifongique). Tout résultat ayant motivé un appel téléphonique est notifié dans le dossier informatique du patient.

Données bibliographiques :	
Milieu PAGANO	Performance of selective and differential media in the primary isolation of yeasts from different biological samples. Silva JO1, Franceschini SA, Lavrador MA, Candido RC. Pagano-Levin Candida test medium: evaluation using vaginal samples. Sinski JT, Kelley LM, Reed GL.J Clin Microbiol. 1975 Feb;1(2):206-11. EH.Appl Microbiol. 1966 Jul;14(4):525-8. Modified Pagano Levin medium to isolate Candida species. Stedham MA, Kelley DC, Coles EH. Appl Microbiol. 1966 Jul;14(4):525-8. - Tetrazolium medium as an aid in the routine diagnosis of Candida1. MAIRE J. DENNY AND BETTY M. PARTRIDGE. J. clin. Path. (1968), 21, 383-386

Conclusion : Cette méthode est validée et il est essentiel de rappeler que l'identification finale tient compte des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques du champignon



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

Méthode validée
Biologiste :

Annexe n°1

VALIDATION DES METHODES des GELOSE SABOURAUD +CHLORAMPHENICOL+ GENTAMICINE + TTZ (stérilité et dessèchement)

LEVURES TESTEES: SOUCHE ATCC
Candida albicans N° 90028

JOURS	ENSEMENCER LE:	POUSSE A 48H	INDENTIFICATION TEST LATEX BLCA FUMOUCZE	CONTAMINATION	DESSECHEMENT DE LA GELOSE	
J 1	17/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	lot des géloses: 17-12-2007
J 2	18/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	date de fabrication:17-12-2007
J 3	19/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 4	20/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	lot test latex BLCA: 7446
J 5	21/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 6	21/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 7	21/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 8	24/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 9	24/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 10	26/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 11	27/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 12	28/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 13	31/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 14	02/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

J 15	03/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 16	04/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 17	07/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 18	08/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 19	09/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 20	10/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 21	11/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 22	14/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 23	15/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 24	16/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 25	17/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 26	18/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 27	21/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 28	22/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 29	23/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS
J 30	24/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS

VALIDATION DES METHODES GELOSE SABOURAUD + GENTAMICINE + TTZ

LEVURES TESTEES: SOUCHE CKRU CQ 6258

JOURS	ENSEMENCER LE:	POUSSE A 48H	IDENTIFICATION TEST LATEX CKRU	CONTAMINATION	DESSECHEMENT DE LA GELOSE	
J 1	17/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	lot des géloses: 17-12-2007
J 2	18/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	date de fabrication: 17-12-2007
J 3	19/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode
de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

J 4	20/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	lot test latex CKRU: 7547
J 5	21/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	périmé le : 31/03/08
J 6	21/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 7	21/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 8	24/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 9	24/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 10	26/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 11	27/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 12	28/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 13	31/12/2007	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 14	02/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 15	03/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 16	04/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 17	07/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 18	08/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 19	09/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 20	10/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 21	11/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 22	14/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 23	15/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 24	16/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 25	17/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 26	18/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 27	21/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 28	22/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 29	23/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	
J 30	24/01/2008	+	agglutination positive	ABS	ABS	



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode
de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

Annexe 2 : Corrélation entre examen direct et culture mycologique

période d'évaluation:	du 01/09/2014 au 30/09/2014
nombre total d'échantillons traités durant la période:	277
nombre total d'échantillons exploitables (ayant 1 ED et au moins 1 culture)	231

corrélation entre ED et culture : n=231

nombre d'échantillons où ED concorde avec la culture	192	83,12%
nombre d'échantillons où ED ne concorde pas avec la culture	39	16,88%
<i>total</i>	<i>231</i>	<i>100,00%</i>

analyse des données où ED et culture non concordant: n=39

Absence d'élément à ED mais Présence de pousse en culture	30	76,92%
Présence d'éléments à ED mais Absence de pousse en culture	9	23,08%
<i>total</i>	<i>39</i>	<i>100,00%</i>



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

Annexe n°3 : Comparaison gélose CANDICHROM versus gélose PAGANO

PATIENT	ENSEMENCEMENT	POUSSE 48H ASPECT MACRO	
		CANDICHROM II géloses "gratuites" pour test coffret de 20 boîtes lot n°140226 dp 31/05/14	PAGANO le 11/3 lot 040314 le 12/3 lot 110314 le 13/3 lot 050314 le 18/3 lot 060314
140311 1121 01 Pus profond (drain)	le 11/03	boîte de gélose envahie (nombreuses colonies bleu/verte souche pure <i>Candida albicans</i> (CALB))	boîte de gélose envahie (nombreuses colonies blanches) -->test rapide-->BLCA+ -->CALB
140311 2732 01 selle	le 11/03	2 types de colonies bleu/vert :CALB - col crème+ colonies luisantes(ED=Bactérie) --> impossible de numérer	2 types de colonies col1:n=650000 test rapide-->RTT+--> <i>Candida glabrata</i> (TGLA) -col3: n=7000 test rapide-->BLCA+-->CALB
140311 2787 01 (expectoration)	le 11/03	2 types de colonies boîtes envahies; -col1: col bleu/vert --> CALB col2: présence col crème+ colonies luisantes(Ed=Bactérie)	2 colonies ≠ -col1:n=150--> test rapide-->BLCA+--> >CALB -col2: n=4300 -->test rapide--> >RTT+-->TGLA
140312 1732 01 (rincage de bouche)	le 12/03	1 type de colonie n=1160 col bleu/vert-->CALB	1 type de colonie : n= 1600 -->test rapide -->BLCA+-->CALB



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

140313 2832 01 (bouche)	le 13/03	1 type de colonie n=80 col bleu/vert -->CALB	1 type de colonie n=120 --> test rapide -->BLCA -->CALB
140317 3107 01 (selle)	le 17/03	1 type de colonie colonies duveteuses n=220000, scotch= <i>Geothricum</i> (GEOT)	1 type de colonie col duveteuse n=420000 scotch=GEOT MALDI -TOF= <i>Geothricum silvicola</i>
140318 0849 01 (selle)	le 18/03	2 types de colonies boites envahie n>10-3 colonies bleu/vert --> CALB	1 type de colonie colonie blanche n>10-3 -->test rapide-->BLCA+-->CALB
140318 0938 01 (expectoration)	le 18/03	2 types de colonies : colonies bleu/vert +colonies luisante(Ed=Bactérie) n>200-- > CALB	1 type de colonie colonie blanche n>200 -->test rapide -->BLCA+ -->CALB

Récapitulatif

échantillons patients n=8	Souche isolées sur gélose CANDICHROMII	Souche isolées sur gélose PAGANO
	7 <i>Candida albicans</i>	7 <i>Candida albicans</i>
	1 <i>Geothricum</i>	2 <i>Geothricum</i>
	3 pousses bactéries	2 <i>Candida glabrata</i>



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

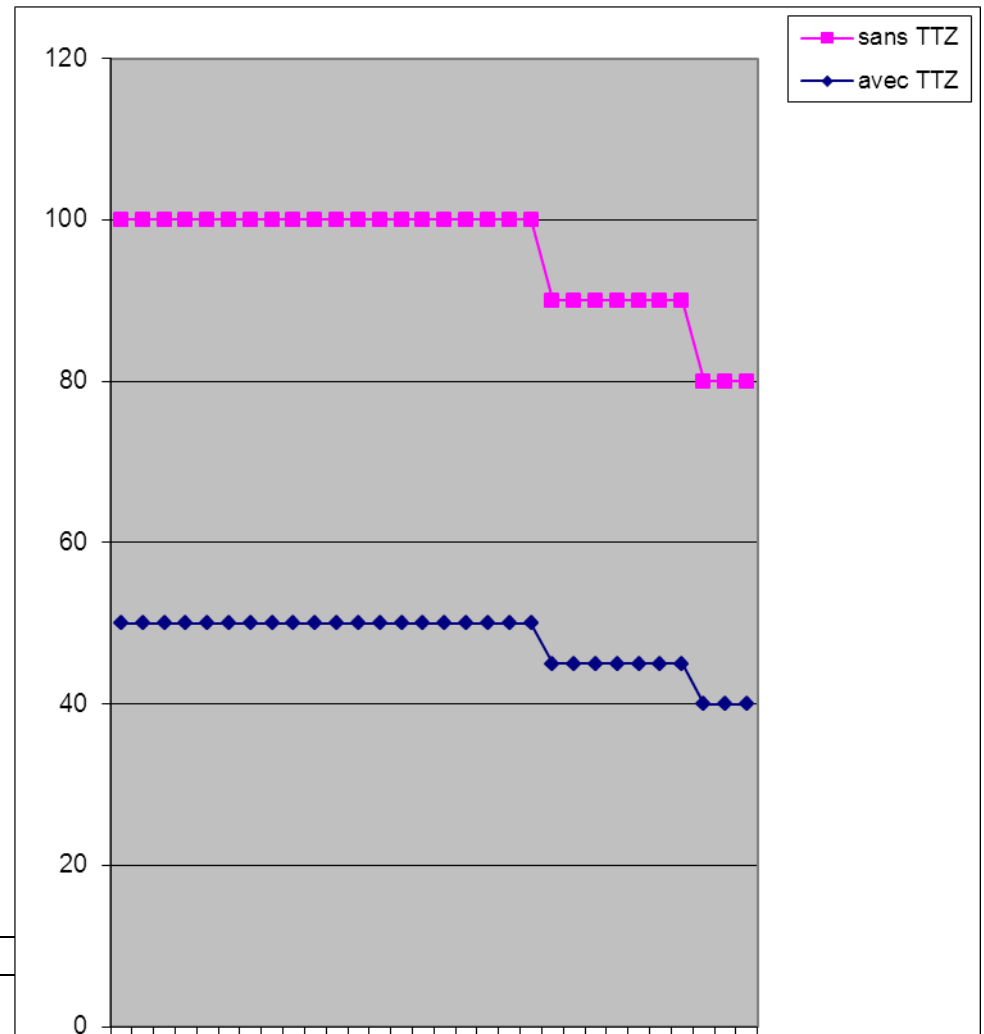
Date d'application : 15/04/11

Annexe n°4

test dessiccation des géloses Sabouraud

hauteur de gélose en millimetres

jours	avec TTZ (milieu PAGANO)	sans TTZ
J 1	50	50
J 2	50	50
J 3	50	50
J 4	50	50
J 5	50	50
J 6	50	50
J 7	50	50
J 8	50	50
J 9	50	50
J 10	50	50
J 11	50	50
J 12	50	50
J 13	50	50
J 14	50	50
J 15	50	50
J 16	50	50
J 17	50	50
J 18	50	50
J 19	50	50
J 20	50	50
J 21	45	45
J 22	45	45



Ref: Version :Version Indice : indicet

Titre



FICHE TYPE QUALITATIF

Vérification (portée flexible A) d'une méthode
de biologie médicale

Référence : SH FORM 44

Indice de révision : 00

Date d'application : 15/04/11

J 23	45	45
J 24	45	45
J 25	45	45
J 26	45	45
J 27	45	45
J 28	40	40
J 29	40	40
J 30	40	40

conclusion: le seuil d'acceptabilité pour l'ensemencement d'une gélose Sabouraud est de 30 jours.

Biologiste :